

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



S-glutationilação de proteínas: mecanismos e relevância biológica

Raquel Jesus Ferreira da Cunha

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



S-glutationilação de proteínas: mecanismos e relevância biológica

Raquel Jesus Ferreira da Cunha

Monografia do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Professor Doutor Vasco Branco

2017

## índice

1 Introdução.....	pág 9
2 Objetivos.....	pág 10
3 Metodologias.....	pág 10
4 Mecanismos de S-glutationilação de proteínas.....	pág 11
5 Importância fisiológica da S-glutationilação.....	pág 13
6 S-Glutationilação e o stress oxidativo.....	pág 16
7 Desreguladores do processo de S-Glutationilação.....	pág 16
8 S-glutationilação na doença.....	pág 17
8,1 S-glutanionilação e o cancro.....	pág 18
8.2 Doença cardíaca.....	pág 19
8.3 Diabetes.....	pág 20
8.4 Doença de Alzheimer.....	pág 21
8.5 Doença de Parkinson.....	pág 21
8.6 Doença de Huntington.....	pág 22
8.7 Ataxia de Friedreich.....	pág 22
8.8 Esclerose Lateral Amiotrófica.....	pág 23
9 Potencial terapêutico da S-glutationilação.....	pág 23
10 Considerações finais.....	pág 24
11 Referências bibliográficas.....	pág 25

## índice de Figuras

Figura 1.....	pág 11
Figura 2.....	pág 11
Figura 3.....	pág 13
Figura 4.....	pág 15
Figura 5.....	pág 18

## Resumo

A S-glutationilação é uma modificação pós-tradução (PTM) reversível que adiciona glutathione (GSH) aos grupos tiol dos resíduos de cisteína, originando proteínas glutathioniladas (PSSG). Esta reação pode ser catalisada por enzimas da família das glutathione-S-transferases (GSTs) e revertida por redoxinas, como a glutaredoxina (Grx). Existem também mecanismos sem catálise, em que se formam numerosos intermediários reativos. A S-glutationilação está envolvida no folding proteico, na degradação de proteínas, homeostase do cálcio, sinalização celular e estrutura do citosqueleto. No stress oxidativo, a S-glutationilação protege os grupos tiol de oxidações irreversíveis. Nestas condições a S-glutationilação espontânea é frequente, existindo várias substâncias com capacidade de afetar a taxa de S-glutationilação. Entre os indutores tem-se o cádmio, tratamento com L-arginina; exposição a LDL oxidadas, fumo de cigarros e condições hipertóxicas, GSNO, ácido sulfénico, chumbo e aumento dos níveis de NO. A inibição da S-glutationilação dá-se, por exemplo, durante sobredosagem de paracetamol. Dada a função protetora da S-glutationilação no stress oxidativo, esta PTM parece ser um bom biomarcador de condições oxidativas. Como tal, existe potencial para o desenvolvimento de novas terapêuticas no âmbito de doenças associadas ao envelhecimento - dado que o stress oxidativo é um dos seus *hallmarks* - em patologias como as doenças oncológicas e doenças neurodegenerativas. Existem também evidências da implicação da S-glutationilação no desenvolvimento da diabetes e doenças cardiovasculares.

## Abstract

S-glutathinylation is a reversible post-translational modification (PTM) that adds glutathione (GSH) to the thiol groups of cysteines, originating glutathionylated proteins (PSSG). This reaction can be catalyzed by glutathione-S-transferase (GST) enzymes and reversed by redoxins like Grx. There are also mechanisms without catalysis, where numerous reactive intermediaries are formed. S-glutathinylation is involved in protein folding, protein degradation, calcium homeostasis, cellular signaling and cytoskeleton's structure. In oxidative stress s-glutathinylation protects thiol groups from irreversible oxidations. Under those conditions, the spontaneous S-glutathinylation is frequent. There are various substances with capacity to affect the rate of S-glutathinylation. Among the inductors, are low cadmium concentrations, , treatment with L-arginine, exposition to oxidized LDL, smoke and hypertoxic conditions, GSNO, sulfenic acid, Pb and elevation of NO levels,. The inhibition of S-glutathinylation occurs by overdose of acetaminophen, for example. Given the protective function of S-glutathinylation during oxidative stress, this PTM seems to be a good biomarker of oxidative stress. Therefore, it has therapeutic potential in the development of new treatment strategies in diseases related with age, since oxidative stress is one of its hallmarks in pathologies like oncologic diseases and neurodegenerative diseases. There are evidences of S-glutathinylation is being involved in diabetes and cardiac diseases development.

## Lista de abreviaturas

2-AAPA – ácido 2-acetilamino-3-[4-(2-acetilamino-2-carboxietilsulfaniltiocarbonilamino)feniltiocarbamilsulfanil]propiónico

AF – ataxia de Friedreich

AP-1 – proteína ativadora 1

AR – aldose redutase

ATP – adenosina trifosfato

ASK – quinase reguladora de sinais de apoptose

AVC – acidente vascular cerebral

BCKdh – 3-metil-2-oxobutanoato desidrogenase

BHE – barreira hematoencefálica

CYP450 – citocromo P450

DA – doença de Alzheimer

Daxx – proteína de domínio associado a morte celular

DJ-J – proteína do gene ligado a Parkinson precoce

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – doença de Parkinson

eNOS – sintase endotelial do monóxido de azoto

ERK1/2 – quinases 1 ou 2 reguladas por sinais extracelulares

FAD – dinucleótido de flavina e adenina

FMN – mononucleótido de flavina

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GCL – glutamina-cisteína ligase

GPI – glicosilfosfatidilinositol

GR – glutathione redutase

Grx – glutarredoxina

Grx2 – glutarredoxina 2

GS\* - radical sulfidril

GRx-S-S-G\* - intermediário radicalar formado com a glutarredoxina em reações catalisadas pela mesma

GSH – glutathione

GSNO – S-nitroglutathione

GSSG – glutathione oxidada

GSTP – glutathione S-transferase P

GSTs – glutathione S-transferases

GST $\pi$  – glutathione transferase pi

GSTO1 – glutathione S-transferase omega 1

IC50 – concentração inibitória de 50% da população

IKK – quinase I $\kappa$ B

JNK – quinase do N-terminal da c-Jun

Kir4.1-Kir5.1 – canal de potássio

MAPK – proteína quinase ativada por mitogénios

L-NAME – éster metil N-nitro-L-arginina  
LDL – lipoproteínas de baixa densidade  
MEKK1 – quinase quinase ativada por mitogénios 1  
NAC – N-acetilcisteína  
NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida  
NAPQI – imina N-acetil benzoquinona  
NF1 – fator nuclear 1  
NFkB – fator nuclear kB  
NO – monóxido de azoto  
Nrf2 – fator nuclear eritroide 2  
Odh – D-octopina desidrogenase  
p53 – proteína do gene supressor de tumores  
Pdh – piruvato desidrogenase  
PI3K – fosfatidilinositol quinase  
PKC – proteína quinase C  
PSSG – proteína S-glutationilada  
PTEN – fosfatase e tensina homóloga  
PTM – modificação pós-tradução  
PTP1B – tirosina fosfatase proteica 1B  
PTPs – fosfatases de tirosina proteica  
Ras – proteína controladora do crescimento celular  
RNS – espécies reativas de azoto  
ROS – espécies reativas de oxigénio  
RSH – molécula com tiol disponível para reações  
RyR – recetor de rianodina  
RyR-SSG – recetor de rianodina S-glutationilado  
SERCA – Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático  
SNC – sistema nervoso central  
SODI – superóxido dismutase I  
SOH – ácido sulfénico  
SQR – succinato-coenzima Q redutase  
TDOR – tiodissulfido oxirredutase  
TRPC – Transient Receptor Potential Canonical  
TRx – tiorredoxina  
VSM – músculo liso vascular  
VSMC – células do músculo liso vascular



## 1. Introdução

As modificações pós-tradução (PTM) são processos covalentes que alteram as propriedades das proteínas por proteólise (1), o que pode resultar em: a) remoção de fragmentos polipeptídicos (2); b) adição de um grupo a outro grupo funcional; c) adição de mais aminoácidos (1), afetando normalmente as cadeias laterais dos aminoácidos da proteína, mas não interferindo com a estrutura da cadeia polipeptídica (2). Estas modificações podem determinar o estado de atividade da proteína, a localização, *turnover* (1), interações com outras proteínas (1), (3), estabilidade de proteínas, metabolismo e transdução de sinal (3). As principais reações pós-tradução são a fosforilação, metilação, acetilação, glicosilação, associação de glicosilfosfatidilinositol (GPI), adição de hidroxiprolina, sulfatação, formação de ligações dissulfeto, deamidação, adição de ácido piroglutâmico, ubiquitinação (1) e modificações oxidativas na cisteína como S-nitrosilação e S-glutationilação (4).

As modificações pós-tradução das cadeias laterais de aminoácidos e a adição de grupos prostéticos são também essenciais para algumas proteínas serem funcionais. Exemplos são a transformação de apoproteínas em enzimas, através da adição de grupos às cadeias laterais de aminoácidos da apoproteína, alterações na atividade enzimática, sinalização de proteínas para o proteossoma ou outros organelos celulares e alterações espaciais na estrutura da proteína sintetizada *de novo*. (2)

As modificações pós-tradução modulam ainda interações proteína-proteína. As proteínas com PTMs aparecem envolvidas em mais ligações físicas, com um coeficiente de agregação reduzido entre as proteínas com as quais reagem, e são geralmente mais centrais em redes proteicas do que proteínas sem PTMs. Por exemplo, proteínas fosforiladas foram detetadas em posições centrais nas interações entre proteínas, enquanto que proteínas não-fosforiladas se situam na periferia dessas interações (3).

As PTMs são uma evasão natural à estagnação genética, visto que as sequências genéticas apenas se alteram a uma escala de evolução e não num organismo adulto nem no combate a doenças. As PTMs permitem a alteração das propriedades dos aminoácidos, se requerido, numa escala de desenvolvimento ou fisiologia dos indivíduos. (5)

De entre as PTM, a S-glutationilação (PSSG), que consiste na modificação dos resíduos de cisteína (Cys) das proteínas por adição de uma molécula de glutatona (GSH), está envolvida na resposta celular ao stress oxidativo, na regulação fisiológica de enzimas, estando também envolvida na etiologia de determinadas doenças, sejam autoimunes, degenerativas ou cardiovasculares.

Nesta revisão serão abordados tanto o processo de S-glutationilação, as suas funções, algumas patologias nas quais está implicada e o seu potencial enquanto alvo terapêutico.

## 2. Objetivos

O Objetivo desta monografia é elaborar uma revisão crítica acerca dos mecanismos pelos quais as proteínas são modificadas por S-glutationilação e qual a relevância fisiológica deste processo. Em detalhe, este trabalho procurará:

- Discutir os mecanismos pelos quais ocorre a PSSG e quais as enzimas responsáveis, bem como da reação reversa de desglutationilação;
- Identificar quais os fatores que influenciam o processo de S-glutationilação e a sua taxa;
- Compreender qual o papel da PSSG no normal funcionamento das células bem como no desenvolvimento de diversas patologias;
- Analisar o potencial terapêutico da S-glutationilação.

Palavras-chave: S-glutationilação; glutatona; stress oxidativo; antioxidantes; glutatona-S-transferase; gluta-redoxina;

## 3. Metodologias

Esta monografia de revisão suportou-se em material já publicado, nomeadamente artigos publicados em revistas científicas e livros. Para além das palavras-chave já citadas, os termos de pesquisa utilizados incluíram: indutor e inibidor, Parkinson, Alzheimer, Huntington, ataxia de Friedreich, entre outros.

Os critérios de inclusão foram fontes fidedignas, recentes, e assuntos relevantes para o tema em estudo., não tendo sido utilizadas fontes anteriores a 2001. Verifica-se que 82% dos artigos utilizados são dos últimos 10 anos.

#### 4. Mecanismos de S-glutationilação de proteínas

A molécula envolvida na S-glutationilação é a L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina ou glutathione (GSH) (6). A estrutura da GSH encontra-se na figura 1.

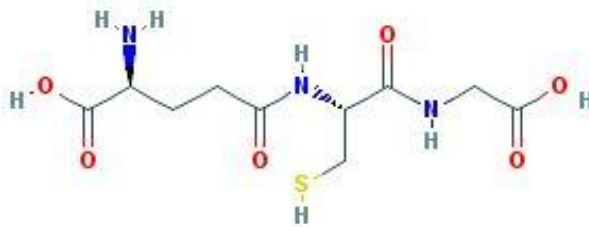


Figura 1: Estrutura da glutathione (7)

Esta molécula localiza-se maioritariamente no citoplasma das células, mas distribui-se por vários outros organelos (e.g. mitocôndria, núcleo). A sua síntese ocorre em duas etapas sequenciais (Figura 2). A primeira reação é catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL). Esta enzima une o L-glutamato à L-cisteína, sendo que a ligação ocorre entre o grupo amina da Cys e o grupo carboxilo da cadeia lateral do glutamato, formando um dipéptido, a γ-glutamilcisteína (6). Esta reação é limitada pela concentração de cisteína (10). A glutathione sintetase (GS) catalisa a ligação do grupo α-carboxilo da Cys pelo ATP, com o grupo amina da glicina, formando-se um tripéptido, a glutathione (6).

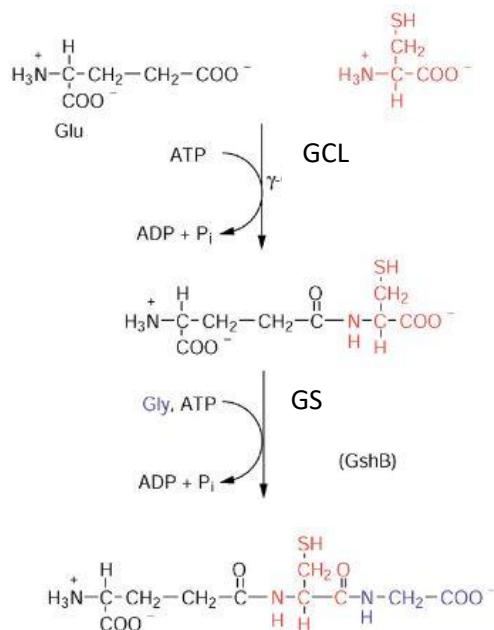


Figura 2: Síntese da glutathione (8)

A oxidação da GSH ao nível do grupo tiol (SH) do resíduo de Cys origina dissulfato de glutathione (GSSG), que é normalmente exportada das células de modo a manter um rácio elevado GSH/GSSG (9).

A  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) é uma glicoproteína heterodimérica da superfície celular que catalisa a degradação da GSH e GSSG extracelulares, hidrolisando a ligação  $\gamma$ -glutamyl entre o glutamato e a cisteína e promovendo a libertação de cisteinilglicina e Glu. A cisteinilglicina é clivada pela dipeptidase ligada à membrana em Cys e Gly. A cisteína resultante pode ser transportada para a célula. Este mecanismo de recuperação assegura os aminoácidos requeridos para a neogénese da GSH (10).

A GSH desempenha várias funções nas células (e.g. regulação do estado redox de proteínas, conjugação com xenobióticos), sendo uma delas a modificação pós-translacional de proteínas, nomeadamente, dos resíduos de Cys, num processo designado de S-glutathionilação (PSSG). A PSSG é uma modificação pós-tradução reversível que constitui um controlo homeostático, sendo uma modificação pós-tradução dependente do estado redox de célula que é determinado pelo GSH/GSSG (10)

A nucleofilia da glutathione é-lhe conferida pelo grupo tiol da cisteína, que é rico em eletrões e as suas orbitais *d* permitem vários estados de oxidação (4). Contudo o grupo SH tem um pKa de 9,65 (na Cys livre) ou 8,5 (na GSH) pelo que a Cys da GSH se encontra normalmente protonada (10). Como tal, as reações de conjugação envolvendo GSH são normalmente catalisadas por enzimas, as glutathione-S-transferases que, a pH fisiológico, se ligam à GSH, baixando o pKa do tiol, formando anião tiolato ( $\text{GS}^-$ ), o que facilita a conjugação (11).

Como tal, as glutathione-S-transferases são as principais enzimas responsáveis S-glutathionilação. Estas enzimas encontram-se no citoplasma, mitocôndria e estruturas microssomais ligadas à membrana, sendo que existem várias classes de GSTs citosólicas: Alpha; Mu; Omega; Pi; Sigma; Theta; Zeta (10). Em células expostas a S-nitrosoglutathione, a S-glutathionilação rápida de proteínas celulares é catalisada pela glutathione transferase omega (GSTO1). A glutathione transferase Pi ( $\text{GST}\pi$ ) catalisa a S-glutathionilação *in vivo* (12). Na mitocôndria, a glutaredoxina-2, uma oxirredutase de tióis, é também conhecida por catalisar a S-glutathionilação (13). A Grx também promove a S-glutathionilação pela combinação de um radical  $\text{GS}^\bullet$  com um radical sulfidril proteico (Proteína- $\text{S}^\bullet$ ). Nesta reação, a Grx estabiliza o radical  $\text{GS}^\bullet$  pela formação intermédia de um radical dissulfido aniónico ( $\text{Grx1-SSG}^\bullet$ ) (11).

A GSH reduzida pode igualmente ligar-se de forma covalente a radicais tiol ( $\text{RS}^\bullet$ ) de forma não-enzimática. Esta reação ocorre em meio ligeiramente básico, por exemplo na matriz mitocondrial, visto que nestas condições as Cys se encontram desprotonadas na forma tiolada ( $\text{-S}^-$ ) e podem: a) reagir facilmente com o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formando ácido sulfénico ( $\text{SOH}$ ); b) formar intermediários que podem reagir com outro RSH, originando uma ligação dissulfido (ProteínaSSR); c) reagir com GSH, originando uma proteína S-glutathionilada (13)

A oxidação do  $\text{S}^-$  proteico por peróxido origina PSOH que, devido ao seu pKa reduzido, pode ionizar e reagir rapidamente com GSH. Por outro lado, os radicais tiil ( $\text{PS}^\bullet$ ) formados durante o stress oxidativo interagem com a GSH, formando um radical glutathionil ( $\text{PSSG}^\bullet$ ) intermediário que pode então reagir com oxigénio para gerar PSSG. (13).

A forma oxidada, a GSSG, também pode originar PSSG, após destruição nucleofílica da ligação S-S pela enzima glutathione reductase, seguida por interação com a forma Cys-

SH (baixo pKa) ou -SOH, formando uma nova ligação dissulfido com resíduos de Cys em proteínas. A GSSG também pode originar PSSG por troca do dissulfeto com o tiol proteico (12).

Existem outros mecanismos, em condições de stress oxidativo ou nitrosativo, nos quais as reações ocorrem pelos dois mecanismos já enunciados por reação de um nitrosol com uma proteína-SH, outras reações ocorrem por consumo de radicais GS<sup>•</sup> e, por último, uma reação catalisada pela Grx ou pela GSTO1, onde se forma um intermediário dissulfeto radicalar aniônico (ex.: GRx-S-S-G<sup>•-</sup>) que transfere o radical tiolado para a GSH ou Proteína-SH para resultar em GSSG ou uma proteína S-glutationilada. (12)

Na formação de proteínas S-glutationiladas podem gerar-se intermediários da sulfanilamida, tiosulfinato, além dos enunciados anteriormente (14). Na figura 3 estão os mecanismos da S-glutationilação, incluindo os que implicam intermediários.

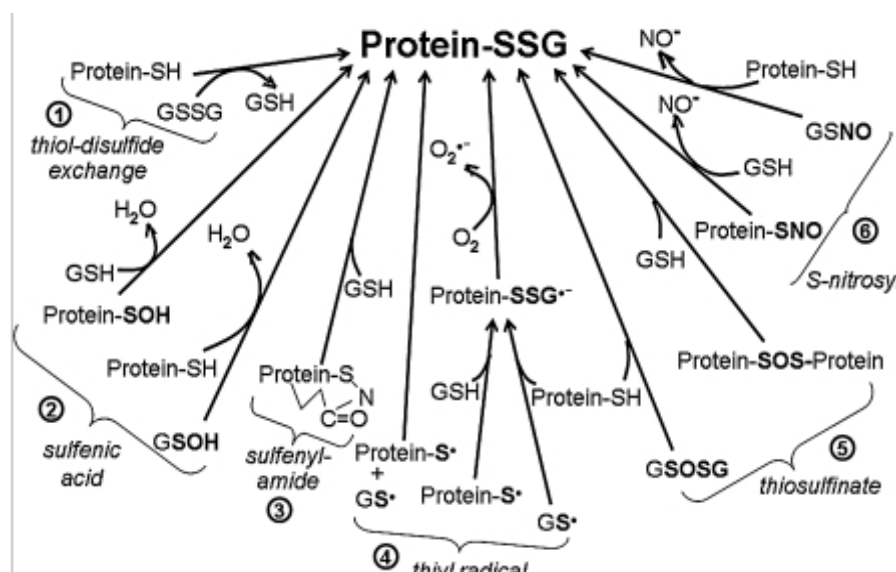


Figura 3: Mecanismo da S-glutationilação de proteínas. Esta figura esquematiza vários mecanismos pelos quais os tióis proteicos podem ser convertidos em PSSG. (1) via troca de dissulfido (2) via intermediários do ácido sulfénico (3) via intermediários de sulfanilamida (4) por intermediários do radical til (5) formação de intermediários tiosulfinato (6) com intermediários S-nitrosil (14).

A desglutationilação é catalisada pelas tioldissulfido oxirredutases (TDOR), como a glutarredoxina (Grx) e tiorredoxina (Trx). A Grx é a principal catalisadora desta reação. No entanto, a Grx depende da presença de GSH pelo que, quando a GSH está muito oxidada, isto é, quando os níveis de GSSG são elevados, a desglutationilação processa-se por um mecanismo alternativo, envolvendo a enzima tiorredoxina (Trx), que não depende dos níveis de GSH (15).

## 5. Importância fisiológica da S-glutationilação

A S-glutationilação de proteínas altera a sua massa molecular, a carga, a estrutura ou função e/ou previne a degradação por oxidação ou proteólise. Também é importante em certos clusters celulares de sinalização, nomeadamente em vias com quinases e fosfatases (11).

As proteínas que sofrem S-glutationilação estão envolvidas, maioritariamente, nas seguintes atividades celulares: homeostasia redox; folding proteico; degradação de proteínas; homeostasia do cálcio; hiperglicemia e stress oxidativo; vias de sinalização celular; glicólise e metabolismo energético, como o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa a nível mitocondrial; citoesqueleto; apoptose (14).

Ao regular a homeostasia celular a S-glutationilação controla o folding proteico e a estrutura terciária de proteínas. A modificação de proteínas-chave que participam na sinalização celular e, consequentemente, das suas interações com outras moléculas leva a que ocorram interações com outras modificações pós-tradução e a novos padrões de transdução de sinal. Como tal, a S-glutationilação tanto está envolvida na sobrevivência celular, ativando ou inibindo funções celulares, como na morte celular, por potenciar a apoptose (12). Na figura 4, estão as funções da glutathionilação de proteínas.

No citoplasma, a S-glutationilação modifica fatores de transcrição, nomeadamente proteína ativadora 1 (AP-1) (14), sendo que esta é um heterodímero que inclui as proteínas Jun, Fos e ATF (16), fator nuclear kB (NFkB) (14), que é um fator de transcrição citoplasmático ativado por numerosos fatores endógenos e exógenos e que regula a expressão de vários genes envolvidos na resposta inflamatória (17), e fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) (14), que regula vários genes envolvidos na resposta antioxidante (18). Após a translocação da proteína S-glutationilada para o núcleo, dá-se a sua desglutationilação e a ligação dos fatores ao DNA, ativando a transcrição dos genes-alvo (13).

A S-glutationilação de proteínas do citoesqueleto, como a actina e miosina, afeta a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, proliferação e diferenciação (13). A actina é glutathionilada na Cys374, sendo que a taxa de glutathionilação influencia a formação de fibras de stress, sendo importante para a regulação do sistema actina-miosina. Por sua vez, a desglutationilação aumenta a taxa de polimerização da actina (4).

Esta PTM é ativadora nos casos da glutathione-S-transferase microssomal, fosfatase da anidrase carbónica III, protéase do HIV, metaloproteinase de matriz, hRas-Cys118,  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) e complexo II mitocondrial. (14).

A mitocôndria realiza S-glutationilação de proteínas para as proteger do dano oxidativo. Neste organelo, as enzimas de síntese da glutathione estão ausentes pelo que toda a GSH tem que ser importada. De um modo geral a concentração de GSH na matriz da mitocôndria é equivalente à do citosol (13).

Como explicado anteriormente (ver ponto 4), na mitocôndria a formação de PSSG de forma não enzimática pode ocorrer em condições fisiológicas, dependendo do ambiente redox. Para esta reação contribui o folding da mitocôndria, através do qual a membrana interna da mitocôndria cria subcompartimentos na matriz e espaço intermembranar, que podem gerar diferentes ambientes com diferente estado redox. Isto significa que a mitocôndria pode originar vários gradientes redox em condições fisiológicas, o que gera proteínas mais acessíveis à S-glutationilação espontânea. Existem proteínas mitocondriais, como o Complexo I e a Odh, que são sensíveis à S-glutationilação. As proteínas e enzimas possuem alvos de S-glutationilação que são ricos em aminoácidos com carga positiva, rodeando uma cisteína modificável (13).

Na mitocôndria, a S-glutationilação modifica a atividade de componentes da cadeia transportadora de eletrões (12), como o complexo I, modulando a fisiologia, estrutura e

metabolismo energético da mitocôndria. Outras proteínas mitocondriais como o complexo mitocondrial II são inibidas quando sujeitas a PSSG. Por sua vez, a Ca ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) também pode ser assim inibida (14).

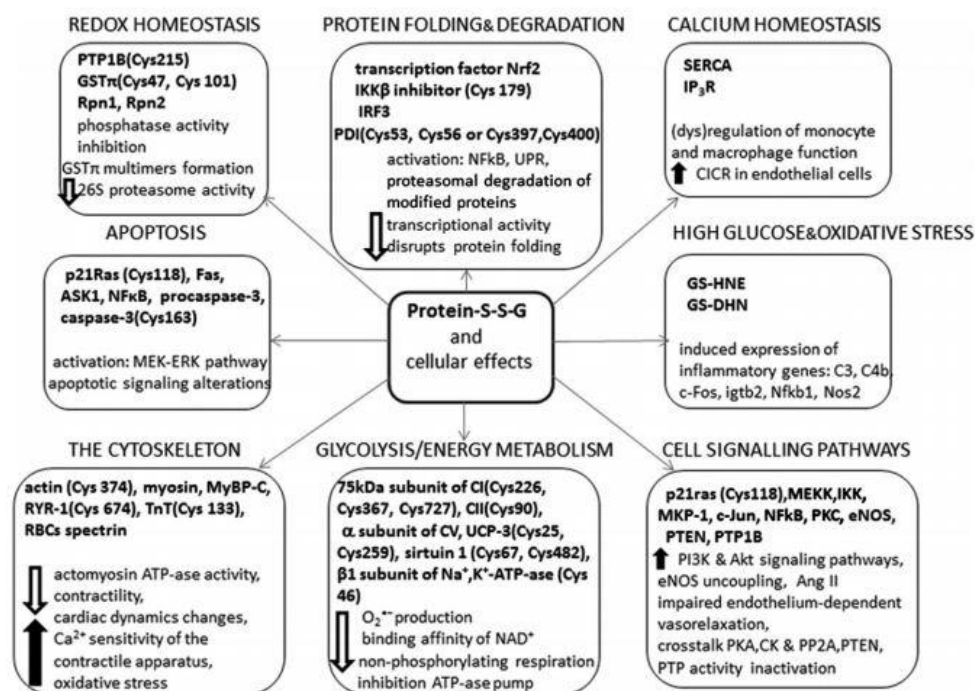


Figura 4: Funções da S-glutationilação de proteínas (13)

A PSSG também pode ter uma função inibitória, como é o caso da S-glutationilação da fosfofrutocinase, anidrase carbônica III, fator nuclear I, gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase (GAPDH), fosfatase de tirosinas proteicas 1B (PTP1B), quinase proteica Cα, fator nuclear κB (NFκB), creatina quinase, fosfatase proteica 2ª, proteína quinase A, tirosina hidroxilase, complexo I mitocondrial e quinase IκB (IKK). (14).

A S-glutationilação da sintase do monóxido de azoto (eNOS) está associada a uma desativação da vasodilatação dependente do endotélio, provocando stress oxidativo e vasoconstrição (12). Tal sucede porque a eNOS é sujeita a regulação redox através da S-glutationilação dos resíduos Cys689 e Cys908, originando dissociação da eNOS e a alteração da função da enzima, que passa a produzir aniões superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em vez da importante molécula sinalizadora NO. Isto faz com que a produção de ROS não seja inibida pelo éster metil N-nitro-L-arginina (L-NAME), que inibe a eNOS. Com a restauração do potencial redox da célula ocorre a desglutinationilação, restaurando a função da eNOS (12).

A PSSG também inibe várias enzimas, nomeadamente, o canal Kir4.1-Kir5.1, tirosina fosfatase de baixo peso molecular, MAPK fosfatase 1, timidina quinase 2 mitocondrial, Na,K-ATPase e a isomerase de dissulfidos proteicos (11).

## 6. S-glutationilação e o stress oxidativo

A produção excessiva de peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (13), radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (19) está associada à ocorrência de stress oxidativo e nitrosativo, podendo provocar danos no DNA mitocondrial, em proteínas, em lípidos e disfunção metabólica (13). Isto ocorre porque os grupos tiol são sensíveis à oxidação por ROS/RNS e outras moléculas eletrofílicas. A existência de tióis com pKa mais baixo leva à sua ionização a pH fisiológico, sendo que os tiolatos reagem mais facilmente com os ROS/RNS que os tióis reduzidos (19).

A S-glutationilação previne a oxidação excessiva de resíduos sensíveis como as Cys, mantendo a integridade das proteínas e a sua função durante o stress oxidativo e assegurando a recuperação de atividade quando a homeostasia é reposta (20). A S-glutationilação em resposta a um peroxinitrito processa-se em 15-30 minutos (19).

A S-glutationilação espontânea (não enzimática) pode ocorrer durante o stress oxidativo, quando a razão entre a GSH e a GSSG se aproxima de 1. Este tipo de S-glutationilação protege os grupos tiol de oxidações irreversíveis no stress oxidativo. A maioria das proteínas alvo da S-glutationilação mitocondriais são S-glutationiladas durante o stress oxidativo. Das 15 proteínas envolvidas no metabolismo, homeostasia de ROS e apoptose, apenas algumas parecem reguladas por S-glutationilação e apresentam padrões de S-glutationilação alterados em diversas doenças (13).

Para além de algumas proteínas estarem sujeitas a maior regulação via PSSG em resultado de níveis fisiológicos de oxidantes gerados durante a sinalização celular ou sob stress, a PSSG incide sobre resíduos de Cys específicos (i.e. nem todos sofrem PSSG). Este facto é corroborado pela demonstração que proteínas mutadas que têm um resíduo de Cys específico ausente não são modificadas e resistem à alteração da atividade enzimática causada por ROS (19).

Durante o stress oxidativo, o complexo com JNK e GSTP é desagregado, e os seus componentes sofrem S-glutationilação. O JNK libertado pode ativar c-Jun, que vai manifestar atividade transcripcional. A GSTP é modificada nas posições Cys47 e Cys101, onde habitualmente se dá a interação com JNK (10).

Por fim, tratando-se a S-glutationilação de uma modificação reversível (10), a desglutationilação pelas Trx ou Grx é responsável pela manutenção do estado reduzido dos tióis das proteínas após o stress oxidativo (21).

## 7. Desreguladores do processo de S-glutationilação

Nesta secção são abordados alguns interferentes da S-glutationilação. Entre estes encontram-se compostos que geram elevadas quantidades de ROS/RNS ou que interagem com a GSH, Grx ou GST.

O stress oxidativo e o consequente aumento de intermediários Proteína-SOH, radicais  $\text{RS}^\bullet$  ou nitrosotióis está associado a um incremento da taxa de S-glutationilação (12).

Metais eletrofílicos como o cádmio, em elevada concentração, diminuem a glutathiona intracelular, aumentando o stress oxidativo. Como o cádmio tem elevada afinidade para os tióis, liga-se à GSH no meio intracelular, formando GSSG. Num estudo com Cd, foram elaborados numerosos ensaios de forma a determinar os diferentes condicionantes no efeito do metal. Foi verificada ação do  $\text{Cd}^{2+}$  na taxa de glutathiona da actina, sendo



que baixas concentrações do elemento (0,5-2  $\mu\text{m}$ ) induzem esta modificação durante 16h, sendo o pico às 6h, enquanto que a concentrações mais elevadas de Cd a taxa de S-glutationilação se manteve nos níveis basais (22). Noutro ensaio registou-se que o aumento da síntese da glutatona deve-se ao efeito do Cd, que é ativador do fator de transcrição 2 (Nrf2), o que leva à sobre-expressão das enzimas de fase II, incluindo a GCL, necessária na síntese da glutatona (22). A oxidação com diamida aumentou a taxa de S-glutationilação mas observou-se que as ROS não estão diretamente envolvidas no efeito do Cd porque apenas as concentrações acima das 2  $\mu\text{m}$  são capazes de aumentar as ROS. Verificou-se também que este efeito não altera o quociente GSH/GSSG (22). O efeito do Cd na PSSG prende-se, portanto, com a inibição não-específica da Grx, diminuindo a taxa de desglutationilação, como foi observado em diversos tipos celulares (22).

Outro interferente estudado em ratos é o paracetamol. Este é um analgésico e antipirético muito usado e que em doses elevadas está associado a problemas de fígado, nomeadamente falência hepática aguda. O paracetamol é metabolizado, maioritariamente, por enzimas de fase II em reações de glucoronidação e sulfatação. Uma pequena quantidade é metabolizada pelo CYP450, que é de fase I, originando imina N-acetil-p-benzoquinona (NAPQI), que é destoxificada por conjugação com a GSH. No entanto, durante um episódio de sobredosagem, o NAPQI está substancialmente aumentado e leva a uma redução drástica dos níveis de GSH e consequentemente da PSSG. Por sua vez, GSSG aumenta mais quanto maior for a dose de exposição. Após a diminuição da GSH, ocorre aumento da permeabilidade mitocondrial, perda do gradiente redox e perda de ATP, levando a necrose (23).

Ao nível do Sistema Nervoso, os astrócitos têm um papel especial no metabolismo da glutatona e no cérebro este antioxidante está maioritariamente localizado nestas células. Os neurónios também dependem dos astrócitos para a entrega de precursores para a síntese da glutatona. A GSH dos astrócitos está associada à ação neuroprotetora destas células contra a excitotoxicidade do glutamato, logo a GSH é importante para as interações astrócito-neurónio. Contudo, compostos neurotóxicos como o chumbo, estão demonstrados em ratos como sendo indutores da PSSG (24).

Outros fatores que aumentam a S-glutationilação são: aumento da síntese de NO quer por estimulação da síntese endógena de NO, quer por estimulação da sintase de NO endotelial na aorta; tratamento com L-arginina; exposição a LDL oxidadas, fumo de cigarros e condições hipertóxicas (20).

## 8. S-glutationilação na doença

Desregulações no controlo das condições oxidativas/reduzidas estão ligadas a muitas doenças humanas, nomeadamente relacionadas com a idade e que estão diretamente relacionadas com a diminuição do quociente GSH/GSSG (10).

Adicionalmente, a exposição a ROS ou a RNS relaciona-se com diversas doenças associadas a desequilíbrio redox. O stress oxidativo causa oxidação de resíduos tiol nas proteínas, e a S-glutationilação pode atenuar o dano causado pela oxidação. Quando o nível de stress oxidativo é baixo, há ativação das vias JNK/NFkB e são induzidas cascatas apoptóticas. Pelo contrário, o elevado stress promove necrose pela inibição das caspases (10).



Outra via afetada pela PSSG é a do JNK que está implicada na sinalização proapoptótica no cancro e medeia a citotoxicidade de muitos fármacos. A proteína ativadora 1 é um fator de transcrição homo e heterodimérico consistindo no Jun (c-Jun, JunB e Jun D) e Fos (c-Fos, Fos B e Fra-1), e regula muitos genes da sinalização de células malignas. O JNK é responsável pela fosforilação da c-Jun, iniciando a atividade transcripcional desta proteína. Uma diminuição no quociente GSH/GSSG provoca mudança do potencial redox, o que provoca oxidação dos tióis do c-Jun por S-glutathionilação e ligação dissulfido entre as subunidades do c-Jun, impedindo a sua ligação ao DNA (10).

A proteína MAPK/ERK cinase cinase 1 (MEKK1), a primeira JNK quinase a ser identificada, fosforila o JNK, ativando-a. A MEKK1, ao ser ativada, transmite um sinal de sobrevivência celular. Contudo, em pacientes humanos com cancro da próstata, compostos como a N-etilmaleimida e a menadiona inibem a MEKK1 por S-glutathionilação do resíduo Cys1238, no domínio de ligação ao ATP da MEKK1 (10).

A ASK é uma MAPKKK que também pode fosforilar o JNK. Ao contrário de MEKK1, a ativação da ASK medeia a apoptose induzida pelo TNF $\alpha$ . A ASK é ativada sob stress oxidativo e a Trx regula-a. Esta associa-se ao N-terminal da ASK1 e inibe-a, mas a oxidação da Trx durante o stress oxidativo, incluindo a S-glutathionilação no resíduo Cys73, quebra a sua ligação à ASK1, ativando esta última. (10).

A S-glutathionilação da Prx mediada pela GSTP através da formação de um heterodímero é um passo intermédio no re-estabelecimento da atividade da enzima Prx. Em condições de stress, a Prx é sujeita a esta reação. Quando a Prx tem uma sobre-expressão causada por interação com o complexo GSTP-JNK, previne a libertação do JNK e provoca resistência à radiação, assim como ocorre supressão do JNK e da apoptose no cancro do pulmão (10).

Neste contexto, a GSTP é um marcador em vários cancros e níveis elevados desta enzima estão associados a resistência a fármacos. Descobriu-se que a GSTP potencia a S-glutathionilação sob stress oxidativo ou nitrosativo. A S-glutathionilação em Cys47 e Cys101 regula a enzima, quebrando as ligações GST $\pi$ -JNK e causa a formação de multímeros de GST $\pi$ . A capacidade da GST $\pi$  catalisar S-glutathionilação em cisteínas proteicas pode ser uma causa da resistência a fármacos anticancerígenos (26).

## 8.2 Doença cardíaca

Há evidências de que ROS, Grx, tioredoxinas e glutathiona contribuem para a fisiopatologia da doença cardiovascular (10).

A S-glutathionilação regula numerosos processos cardiovasculares importantes quer em condições fisiológicas, quer em doenças, nomeadamente, a contração dos miócitos, fosforilação oxidativa, vasodilatação, metabolismo glicolítico e síntese proteica (14).

Após a isquémia provocada por enfarte do miocárdio, ocorre aumento da S-glutathionilação na reperfusão sanguínea dos tecidos isquémicos. O GAPDH é uma proteína muito S-glutathionilada durante a reperfusão, estando este evento associado a uma perda de função da proteína. No fim do evento de reperfusão ocorre desglutathionilação, pelo que a modificação servirá para proteger as cisteínas da GAPDH de oxidações irreversíveis no processo (14). Contrariamente, verificou-se desglutathionilação da succinato-coenzima Q redutase (SQR) mitocondrial durante a reperfusão, o que leva a diminuição da função (14).

O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca depende de vários mecanismos, como Raf/MEK/ERK. Como demonstrado em miócitos ventriculares de rato, a ativação do Raf/MEK/ERK faz-se por S-glutationilação do Ras. A S-glutationilação contribui para a síntese proteica na hipertrofia (14). Também se verificou que a hipertrofia induzida pela angiotensina-II provoca a S-glutationilação do Ras na Cys118, ativando p38 e Akt (10).

O stress oxidativo, a hipóxia, oxidação de LDL e inflamação estão envolvidas na formação de placas arterioscleróticas e promovem a S-glutationilação. O componente maioritário das placas é LDL oxidada. Sabe-se que os macrófagos expostos a estas LDL sofrem maior S-glutationilação e que doentes com arteriosclerose possuem proteínas séricas mais PSSG. A extensão da reação aumenta com a gravidade da doença, pelo que a S-glutationilação das proteínas séricas é um marcador específico e sensível da arteriosclerose das extremidades (14).

A S-glutationilação da Ras (SSG-Ras) contribuirá para a hipertrofia vascular pela ativação da síntese proteica nas células do músculo liso vascular (VSMC). Outra ação da SSG-Ras é a mediação da resposta endotelial às LDL oxidadas, contribuindo assim para a arteriosclerose (14).

Nesta doença o mecanismo regulador da Ca ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) está comprometido. Foi constatado que, durante a arteriosclerose, a oxidação irreversível da Cys674 não permite a regulação por S-glutationilação e contribui para a resposta vasodilatadora inadequada a NO, no músculo liso (14).

### 8.3 Diabetes

A diabetes caracteriza-se por uma hiperglicemia crónica e pode levar a muitas complicações em vários sistemas. As vias que medeiam o dano pela glicose são: (i) aumento dos produtos de glicação; (ii) ativação da via poliol; (iii) ativação da PKC; (iv) ativação da via hexamina (10). Os ROS gerados na cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria são a principal fonte de stress oxidativo na diabetes e estas quatro vias estão relacionadas com esse stress. A S-glutationilação é o mecanismo principal de sinalização redox nos tióis e tem grande impacto na patogénese da diabetes (14).

O primeiro passo da via poliol depende da aldose redutase (AR). As modificações tiol ao nível do resíduo Cys298 regulam a ligação do substrato à AR. A S-glutationilação de Cys298 inibe a atividade da AR em condições fisiológicas. Esta enzima está mais ativa na diabetes, indicando diminuição na sua glutathionilação, o que está em linha com o aumento da atividade da Grx observado em corações e retinas de ratos diabéticos (14).

Os canais de potássio ATP-sensíveis que sinalizam a secreção de insulina nos ilhéus pancreáticos e os canais de K dependentes de voltagem são regulados por S-glutationilação e/ou pela Grx (14). Os primeiros não são inibidos por GSSG, 3 mM. Estudos concluíram que estes canais deverão ser modulados por cisteínas sensíveis a gradientes redox, sugerindo uma regulação por S-glutationilação. Em linha com esta hipótese, sabe-se que a S-glutationilação diminui a libertação de insulina (14).

A transferência celular de  $\text{Ca}^{2+}$  é também um processo crítico na secreção de insulina mediada pela glucose. Os recetores de rianodina S-glutationilados (RyR-SSG) libertam  $\text{Ca}^{2+}$  do ER para o citosol. As suas isoformas são encontradas no pâncreas (RyR1, RyR2 e RyR3), e RyR2 predomina no coração. A libertação controlada de  $\text{Ca}^{2+}$  é importante na sobrevivência das células- $\beta$  e regula a libertação de insulina de forma independente da glucose. RyR1 tem 100 cisteínas e algumas S-glutationilações têm

sido ligadas à liberação de cálcio e pode ser inibida por magnésio das vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo de coelho (14).

O metabolismo da glucose origina NADPH, provocando despolarização da membrana, sugerindo mediação da exocitose de insulina induzida pela glucose. Como a Grx e Trx aceitam elétrons do NADPH, deverão mediar a capacidade de aceitação do NADPH. Contudo, a Trx inibe essa capacidade, e Grx e GSH induzem-na. Pensa-se que neste processo a Grx estará glutathionilada, sendo contudo necessários mais estudos (14).

A fosforilação do recetor de insulina faz parte da sinalização e as fosforilases de insulina (PTPs) desativam-na quando a insulina está ausente. A PTP-1B é específica desta desativação pois a sua inibição aumenta a sinalização de insulina. Sabe-se que a S-glutathionilação inibe reversivelmente o PTP-1B, o que pode ser benéfico na diabetes, pois aumentaria a secreção de insulina (14).

Numerosos mediadores são regulados por S-glutathionilação, e a RAS-SSG está glutathionilada em Cys118, e esta modificação leva à sua ativação no músculo liso vascular (VSM), aumentando a resistência endotelial à insulina, reversível pela Grx. Outros incluem o MEKK-SSG, c-Jun-SSG, NF- $\kappa$ B-SSG e PKC-SSG. A PKC está envolvida na patogénese de numerosas complicações da diabetes e a S-glutathionilação inibe várias isoformas, impedindo os processos patogénicos associados. Porém a Grx desglutathiona as isoformas, promovendo o seu efeito (14).

#### 8.4 Doença de Alzheimer (DA)

A DA é uma doença de demência e caracteriza-se por perda de sinapses no córtex frontal e no hipocampo. Na DA ocorrem placas de beta-amiloide. Registaram-se elevados níveis de S-glutathionilação proteica, tal como modificações oxidativas de macromoléculas, o que indica aumento do stress oxidativo nos doentes de DA. A inibição da síntese de GSH aumenta a inflamação, o que é consistente com o aumento dos níveis de superóxido (27) e com o aumento de GSSG e diminuição de GSH verificados (10) (28).

Registou-se elevada expressão de p53 no cérebro com DA. A p53 possui 10 resíduos cisteína localizados no domínio de ligação ao DNA e são importantes para estabilizar a estrutura terciária do núcleo central da p53 e, consequentemente, a sua função (28). Observou-se glutathionilação na p53 do lóbulo parietal inferior, e diminuição de GSH/GSSG em cérebros de ratos idosos (10). O aumento da S-glutathionilação deu-se nas formas monoméricas e diméricas da p53 (28).

A S-glutathionilação protegerá os grupos SH da p53 das modificações irreversíveis da progressão da DA (28). O aumento de Grx será um mecanismo compensatório do cérebro humano porque a sobre-expressão da enzima previne a toxicidade da beta-amiloide (10).

Diversas proteínas envolvidas no metabolismo da glucose ou metabolismo energético estão S-glutathioniladas em cérebros com DA e revelam perda parcial de função (28).

#### 8.5 Doença de Parkinson (DP)

Esta doença caracteriza-se por perda de neurónios dopaminérgicos na *pars compacta* da substância nigra do cérebro e pela presença de corpos de Lewy. O stress oxidativo

contribui para a neurodegeneração, acumulando proteínas que não tiveram *folding* correto, e para a formação de corpos de Lewy (10).

A patogénese da DP inclui movimento exagerado de dopamina, conteúdo em glutatona diminuído e aumento de ferro na substancia nigra (14). Verificam-se níveis diminuídos de GSH nos neurónios da substancia nigra devido à oxidação da glutatona a GSSG. Também ocorre a formação e deslocamento de conjugados entre a glutatona e bioprodutos eletrofílicos da oxidação lipídica e ainda se regista S-glutationilação de proteínas. A inibição da síntese de glutatona não foi detetada (29).

A S-glutationilação, em presença de GSSG, do complexo I mitocondrial pela Grx2 leva à inibição da sua atividade. Após a diminuição da dopamina, diminuem os níveis de GSH e o complexo I é desativado, registando-se disfunção do complexo I mitocondrial e perda de células dopaminérgicas do corpo estriado e neurodegeneração (10).

Outro inibidor do complexo I é a rotenona e tem sido utilizado como modelo da DP. A rotenona diminui o potencial redox da GSH, mas o precursor da GSH e antioxidante NAC reverteu o efeito da rotenona sobre o potencial redox (10). A Grx tem impacto significativo na regulação redox na DP. A diminuição da proteína DJ-1 (do gene ligado à DP precoce) é evidente após subregulação da Grx, mas a diminuição de GSH não está implicada. Adicionalmente, a proteína Daxx é translocada do núcleo e causa morte celular, e a sobre-expressão de DJ-1 previne essa morte celular. A L-DOPA leva à inibição da GRx e à apoptose (10).

## 8.6 Doença de Huntington (DH)

Problemas na glutatona ou na homeostasia do cálcio devido ao stress oxidativo estão associados à patogénese de doenças neurodegenerativas, como a DH (30). DH está associada a disfunção mitocondrial e é causada por elongação da sequência CAG no exão 1 do gene da proteína de Huntington (10).

Os ratinhos R6 são modelos transgénicos com a mutação 150/150Q de forma a induzir DH. A linha R6/2 constitui um dos modelos utilizados. Não houve diferença entre a GSH da linha R6/2 e os wild-type, mas os ratinhos demonstraram aumento da GSH mitocondrial no córtex e no corpo estriado. Estes ratinhos tiveram uma diminuição na atividade da glutamyl-cisteinil ligase no córtex e diminuição da atividade da G6PD no corpo estriado. A diminuição da atividade enzimática mostra a disfunção na utilização da GSH, enquanto o aumento de GSH traduz-se num mecanismo compensatório do stress oxidativo. Outro estudo nestes ratinhos mostrou um aumento na GSH cerebral, e aumento no mRNA da Grx, da GSH redutase e da glutamyl-cisteinil ligase (10).

O TRPC é sensível ao stress oxidativo e foi demonstrada a sua ativação pela oxidação e o efeito da glutationilação do TRPC na DH. A glutatona oxidada leva à ativação do TRPC pela sua glutationilação na Cys176 e Cys178. Esta modificação causou aumento da  $[Ca^{2+}]$  citosólica e ativação de uma cascata que provoca morte celular aos neurónios do estriado. Nos ratinhos transgénicos YAC128 encontrou-se uma quantidade de glutatona indicativa do estado oxidado do estriado na DH. Encontraram-se níveis elevados de TRPC5 S-glutationilado no estriado, quer em ratinhos transgénicos, quer em doentes de DH. Inibindo a TRPC5, diminuiu a morte de células neuronais do estriado por oxidação (30).

## 8.7 Ataxia de Friedreich (AF)

A ataxia de Friedreich é uma ataxia hereditária causada por extensão da sequência GAA no primeiro intrão da frataxina. Esta proteína é mitocondrial e a perda provocada pela AF provoca disfunção mitocondrial, acumulação de ferro e produção de ROS (10).

Estudos demonstraram que o equilíbrio redox está alterado nos fibroblastos de doentes com AF, estando deslocado para a ligação da glutatona a proteínas. Isto traduz-se por diminuição do rácio GSH/GSSG. Verificou-se S-glutathionilação da actina dos fibroblastos nos doentes com AF, talvez devido à acumulação de ROS. Registou-se então desorganização nos filamentos de F-actina S-glutathionilados. O tratamento com GSH revelou reversão de algumas modificações (31).

## 8.8 Esclerose Lateral Amiotrófica

Esta doença caracteriza-se pela perda progressiva de neurónios motores da medula óssea, tronco cerebral e do córtex cerebral. Aproximadamente 20% dos doentes possuem mutação na superóxido dismutase I (SOD1), enzima que protege do stress oxidativo provocado pelo superóxido. Esta mutação leva à formação de agregados desta enzima que são tóxicos para os neurónios. Outras modificações são perda do potencial da membrana mitocondrial, elevado nível de cálcio citosólico e alterações na estrutura terciária de proteínas e a sua degradação. Tudo isto se deve ao stress oxidativo e morte celular. A S-glutathionilação mostrou estar implicada, visto que a sobre-expressão de Grx1 aumenta a solubilidade da SOD1 mutante no citosol, e a sobre-expressão de Grx2 aumentou essa solubilidade na mitocôndria e protege neurónios da apoptose (29).

## 9. Potencial terapêutico da S-glutathionilação

Dado o papel fisiológico da PSSG, coloca-se a hipótese de a sua formação ou inibição ser uma possível estratégia terapêutica.

O ácido 2-acetilamino-3-[4-(2-acetilamino-2-carboxietilsulfaniltiocarbonilamino) feniltiocarbamilsulfanil] propiónico (2-AAPA) foi utilizado para induzir S-glutathionilação e revelou esse mesmo efeito em células UACC-62. Esta reação foi detetada aos 5 min, com máximo aos 10 min. Uma hora depois, registou-se reversão da S-glutathionilação, registando-se 40% do máximo. A estrutura dos microtúbulos e as suas interações foram perturbadas pela S-glutathionilação. Pode então dizer-se que a S-glutathionilação dos microtúbulos provoca a sua despolimerização (32). Consistentemente, detetou-se o mesmo efeito na tubulina. Isto levará a alterações morfológicas celulares, congelamento do ciclo celular em G2/M e, talvez apoptose (32).

Relativamente à via do NFkB, a S-glutathionilação de diferentes componentes será uma aproximação terapêutica na oncologia e na descoberta de novos fármacos (10).

Outro potencial terapêutico da S-glutathionilação prende-se com a manutenção dos níveis mitocondriais de GSH, visto que a sua diminuição causa a perda do mecanismo necessário para manter as enzimas Odh, Pdh e Bckdh, o que pode levar ao desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas. A Pdh e Odh são complexos enzimáticos que catalisam a conversão do piruvato ou 2-oxoglutarato em acetyl-CoA ou succinil-CoA respetivamente (13).

Ainda outro aspeto em que a investigação da S-glutathionilação terá impacto é o da eNOS. Esta modificação pós-tradução causa a dissociação desta enzima, ficando ela a produzir superóxido em vez de NO. O processo ocorre perante stress oxidativo e é reversível. Ocorre S-glutathionilação em dois resíduos de cisteína na interface entre os

domínios de ligação ao FMN e ao FAD, levando à dissociação e consequente produção de superóxido. Dada a importância do NO e a disfunção da eNOS endotelial implicados em várias doenças como enfarte do miocárdio, AVC, diabetes e cancro, a identificação deste mecanismo regulador do stress oxidativo pode contribuir para a melhoria das várias abordagens terapêuticas e de prevenção (33).

## 10. Considerações finais

Esta monografia procurou abordar os mecanismos de síntese da glutathione e da S-glutathionilação, bem como os seus papéis em condições fisiológicas, de stress oxidativo e patológicas.

A S-glutathionilação tem sido principalmente estudada durante a última década, pelo que a sua utilidade biológica e intervenção na patologia são algo recentes. Tem sido notório que a S-glutathionilação interage com outras modificações pós-tradução na regulação da transdução de sinal, o que resulta em novos padrões de sinalização que poderão permitir a identificação de novos alvos moleculares e o desenho de novas estratégias terapêuticas. Pode considerar-se a S-glutathionilação única, pois participa na sobrevivência celular, ativando ou inibindo funções celulares, e na morte celular, potenciando a apoptose (12).

Sendo que uma das principais funções da S-glutathionilação é proteger os grupos tiol de oxidações irreversíveis e este PTM parece ser um bom biomarcador do stress oxidativo e tem potencial para novas terapêuticas no âmbito de doenças associadas ao envelhecimento, dado que o stress oxidativo é um dos seus *hallmarks*.

Neste sentido, e de acordo com o elencado neste trabalho, será importante desenvolver um maior esforço de investigação relativamente ao papel da S-glutathionilação nas doenças neurodegenerativas e no cancro que são condições patológicas nas quais se verificam estados celulares mais oxidativos.



## 11. Referências bibliográficas

- (1) Mann, M & Jensen, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications, *Nat. Biotechnol.*, 21, Abril 2003, 255-261. Available from: <file:///C:/Users/raquel/Documents/5ºano/Tese/Mann,%20M.%20&%20Jensen,%20O.N.%20Proteomic%20analysis%20of%20post-translational%20modifications.%20Nat.%20Biotechnol.%2021,%20255-261%20(PDF%20Download%20Available).html> [25/05/2017].
- (2) D.G. Knorre, N.V. Kudryashova, and T.S. Godovikova, Chemical and Functional Aspects of Posttranslational Modification of Proteins, *ActaNaturae*, 1, Outubro 2009, 29-51, available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347534/> [25/05/2017].
- (3) Duan G., Walther D., The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks, *pcbi Journal*, Fev 2015, available from: <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004049> [25/05/2017].
- (4) Chung H. S., Wang S., Eyk J. E. V., Cysteine Oxidative Post-translational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System, *Circ Res*, 112(2), Jan 2013, 382-92, Available from: <doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268680> [30/05/2017].
- (5) Prabakaran S. et al., Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding, *WIREs Syst Biol Med*, 2012, available from: <doi: 10.1002/wsbm.1185> [25/0/2017].
- (6) Quintas, A., Freire, A. P., Halpern, M. J. (2008), *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*, Reimpressão Julho 2008, Lousã, LIDEL.
- (7) National Center for Biotechnology Information. PubChem BioAssay Database; AID=2299, Source=Scripps Research Institute Molecular Screening Center. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=2299> [08/09/2017].
- (8) Copley S., Dhilon J., Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes, *Genome Biology*, 3(5), Abril 2002. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC115227/ [07/09/2017].
- (9) Morgan B. et al., Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis, *nature chemical biology*, Dezembro 2012. Available from: <doi:10.1038/NCHEMBIO.1142> [12/09/2017].
- (10) Xiong, Y. et al., S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes, *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, Julho 2011, 233-270, Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3540> [01/07/2017].
- (11) Grek C. L. et al., Causes and Consequences of Cysteine S-Glutathionylation, *JBC Papers in Press*, 288 (37), Setembro 2013 Available from: <doi:10.1074/jbc.R113.461368> [01/06/2017].
- (12) Popov D. (2014), Protein S-glutathionylation: from current basics to targeted modifications, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 120:4 2014, 7 123-130, Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/13813455.2014.944544> [03/05/2017].

- (13) Mailoux, R. J., Willmore W. G. (2014), S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Available from <doi:10.3389/fcell.2014.00068> [10/07/2018].
- (14) Mieyal, J. J., Gallogly, M. M., Shelton, M. D., Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Reversible Protein S-Glutathionylation, *Antioxid Redox Signal*, 10 (11), Nov 2008, 1941-88. Available from: <doi:10.1089/ars.2008.2089> [29/07/2017].
- (15) Subramani J. et al., Thioredoxin uses a GSH-independent route to deglutathionylate endothelial nitric oxide synthase and protect against myocardial infarction, *JBC Papers in Press*, M116.745034, Setembro 2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27587398> [08/09/2017].
- (16) Shaulian E., Karin M., AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene*, 20(19), Abril 2001, 2390-2400. Available from: <http://www.nature.com/onc/journal/v20/n19/full/1204383a.html> [09/09/2017].
- (17) Serasanambati M., Chilakapati S. R., Function of Nuclear Factor kappa B (NF-kB) in human diseases – A Review, *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 2016, 368-387. Available from: <http://www.sijbsojms.com/index.php/SIJBS/article/download/103443/73922> [09/09/2017].
- (18) Nguyen T., Nioi P., Pickett C. B., The Nrf2 Antioxidant Response Element Signaling Pathway and its Activation by Oxidative Stress, *JBC*, 284(20), Maio 2009, 13291-13295. Available from: <http://www.sijbsojms.com/index.php/SIJBS/article/download/103443/73922> [09/09/2017].
- (19) Ying J., Cravreel N., Cohen R. A., Thiol Oxidation in Signaling and Response to Stress, *Free radical biology & medicine*, 43(8), Outubro 2007, 1099-1108, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2043132/> [25/07/2017]. Domenico, F. D. et al., Glutathionylation of the Pro-apoptotic Protein p53 in Alzheimer's Disease Brain: Implications for AD Pathogenesis, *Neurochemical research*, 34(5), Abril 2009, 727-733. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810644/> [29/08/2017].
- (20) Bradford H. G. et al., Measurement and Identification of S-Glutathiolated Proteins, *Methods Enzymol*, 473, 2010, 179-197. Available from: <doi:10.1016/S0076-6879(10)73009-3> [01/7/2017].
- (21) Zweler J. L., Chen C. A., Druhan L. J., S-Glutathionylation Reshapes Our Understanding of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nitric Oxide/Reactive Species-Mediated Signaling, *Antioxidants & Redox Signaling*, volume 14, número 10 de 2011. Available from: <doi:10.1089/ars.2011.3904> [23/07/2017].
- (22) Choong, G. et al. (2013), Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: implications for cytoskeletal integrity, *ELSEVIER*, 272, 2013, 423-430. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872096> [01/08/2017].
- (23) Yang X. et al., Changes in Mouse Liver Protein Glutathionylation after Acetaminofeno Exposure, *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, 340, 2012, 360-368. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263967/> [10/08/2017].
- (24) Struzynska L., Chalimoniuk M., Sulkowski G., The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity, *Toxicology*, 212, 2005,

- 185-194. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X05002040> [18/08/2017].
- (25) Velu, C. S. et al., Human p53 is Inhibited by Glutathionylation of Cysteines Present in the Proximal DNA-Binding Domain during Oxidative Stress, *Biochemistry*, 46, 2007, 7765-7780. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi700425y> [27/08/2017].
  - (26) Townsend D. M. et al., Novel Role for Glutathione S-Transferase  $\pi$ , Regulation of Protein S-Glutathionylation Following Oxidative and Nitrosative Stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1), Janeiro 2009, 436-445. Available from: < Sem vírus. [www.avast.com](http://www.avast.com) [01/09/2017].
  - (27) Miller, O. G., Mieyal J. J., Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases, *Arch Toxicol*, 89, 2012, 1439-1467. Available from: <DOI 10.1007/s00204-015-1496-7> [05/06/2017].
  - (28) Domenico, F. D. et al., Glutathionylation of the Pro-apoptotic Protein p53 in Alzheimer's Disease Brain: Implications for AD Pathogenesis, *Neurochemical research*, 34(4), Abril 2009, 727-733. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810644/> [29/08/2017].
  - (29) Liedhegner E. A. S. et al., Mechanisms of Altered Redox Regulation in Neurodegenerative Diseases – Focus on S-Glutathionylation, Antioxidants & Redox Signaling, 16(6), Março 2012, 543-566. Available from: <http://doi.org/1089/ars.2011.4119> [01/09/2017].
  - (30) Hong C. et al., Increased TRPC5 glutathionylation contributes to striatal neuron loss in Huntington's disease, *BRAIN a journal of neurology*, Junho 2015, 1-18. Available from: <doi 10.1093/brain/awv188 [29/08/2017].
  - (31) Pastore, A. et al., Actin Glutathionylation Increases in Fibroblasts of Patients with Friedreich's Ataxia A Potential Role in the Pathogenesis of the disease, *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), Outubro 2003, 42588-95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915401> [30/08/2017].
  - (32) Chen W. et al., Microtubule S-glutathionylation as a potential approach for antimetabolic agents, *BMC Cancer*, 12:245, 2012. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/245> [02/05/2017].
  - (33) Chen C. A., Wang T. Y., Zwiler J. L., S~glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function, *Nature*, 468, 22 de Dezembro 2010, 1115-1118. Available from: <doi:10.1038/nature09599> [10/07/2017].

